



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 63 198 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/37
C 12 N 11/12
C 12 M 1/40

⑳ Aktenzeichen: 199 63 198.0
㉔ Anmeldetag: 27. 12. 1999
㉕ Offenlegungstag: 20. 9. 2001

DE 199 63 198 A 1

㉑ **Anmelder:**
Schulz-Schaeffer, Walter, Dr., 22175 Hamburg, DE

㉒ **Vertreter:**
Fiedler, J., Dipl.-Ing. Dr.rer.biol.hum., Pat.-Anw.,
37176 Nörten-Hardenberg

㉓ **Erfinder:**
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Verfahren zum topographischen Proteinnachweis an formalinfixierten Gewebeschnitten**

⑤⑦ Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, wobei die Art und Reihenfolge die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt werden:
a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Proteaselösung, wobei
ci) die Proteaselösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und mittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und wobei
cii) der Gewebeschnitt periodisch mit Proteaselösung befeuchtet bzw. überschichtet wird,
d) Waschen der Membran,
e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.
Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt, wobei die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung im Gewebeschnitt entspricht, und wobei die Membran mit einem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellt ist.

Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1, wobei sie ein Gehäuse ...

DE 199 63 198 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine eine Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt.

Das Verfahren, die Vorrichtung zu seiner Durchführung und die Membran sind vor allem für den Einsatz in Verfahren zum immunhistochemischen, semiquantitativen, topographischen Nachweis von Proteinen in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben vorgesehen und geeignet.

Der immunhistochemische Nachweis von Proteinen, die an eine Membran gebunden sind, ist im Stand der Technik sowohl als Teil des Westernblot- als auch als Teil des Histoblot-Verfahrens bekannt. Beim Westernblot-Verfahren werden in wässriger Lösung befindliche Proteine zunächst in einem Polyacrylamidgel gemäß ihrer Laufeigenschaften in einem elektrischen Feld aufgetrennt, in einem zweiten Schritt mittels eines zweiten elektrischen Feldes aus dem Gel heraus auf eine Membran übertragen und auf dieser Membran in einem dritten Schritt einer Immunhistochemischen Nachweisreaktion (mit geeigneten Antikörpern) unterworfen. Beim Histoblot-Verfahren wird ein 5–10 µm dünner Gewebeschnitt von nativ tiefgefrorenem Gewebe auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und das Gewebe lysiert, worauf die in dem Gewebe enthaltenen Proteine daraus freigesetzt werden und an der Nitrocellulosemembran anhaften. Mittels einer immunhistochemischen Nachweisreaktion wird die topographische Verteilung der nachzuweisenden Proteine im Gewebekontext erkennbar.

Das Histoblot-Verfahren hat gegenüber dem Westernblot-Verfahren den Vorteil, dass die Proteine einerseits ihrer natürlichen topographischen Position im Gewebe zugeordnet werden können und andererseits durch das Herauslösen aus dem Gewebe und Immobilisieren an einer Nitrocellulosemembran weiteren chemischen (Vor)Behandlungen, insbesondere Aufschlussreaktionen, unterworfen werden können, die eine sensitivere Detektion im Zuge der immunhistochemischen Nachweisreaktion ermöglichen.

Beide bekannten Verfahren eignen sich jedoch gar nicht für den topographischen und spezifischen Nachweis von denaturierten Proteinen in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben. Die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin ist aber seit Jahren die Standardmethode zur Konservierung von Biopsie- und Autopsieproben in der Pathologie. Das heißt: Für die allermeisten archivierten Gewebeproben gibt es bisher außer der konventionellen Immunhistochemie kein Proteinnachweisverfahren, das hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Topographie der betreffenden Proteine befriedigende Ergebnisse liefert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens, das die Durchführung eines sensitiven und topographischen Nachweises von spezifischen Proteinen in Geweben, welche in Formalin fixiert wurden und in Paraffin eingebettet sind, ermöglicht.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Überführung von Proteinen aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe-

schnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen, topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, das durch die Art und Reihenfolge der folgenden Verfahrensschritte gekennzeichnet ist;

- a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
- b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
- c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Proteaselösung (Peptidase- oder Proteinaselösung), wobei
 - ci) die Proteaselösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und mittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und wobei
 - cii) der Gewebeschnitt nur periodisch, d. h. in zeitlichen Abständen, mit Proteaselösung beträufelt bzw. überschichtet wird,
- d) Waschen der Membran, und
- e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.

Danach erfolgt der Proteinnachweis auf der Membran mit bekannten Nachweismethoden.

Bei der Membran handelt es sich vorzugsweise um eine Nitrocellulosemembran; es kann aber auch eine andere geeignete Membran eingesetzt werden.

Eine weitere Lösung der genannten Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer Membran mit einer Ober- und einer Unterseite, die auf der Oberseite angeordnete Proteine aus einem Gewebeschnitt aufweist, und die dadurch charakterisiert ist, dass die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung dieser Proteine im Gewebeschnitt entspricht, und dass die Membran mit dem vorstehend genannten, erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar bzw. hergestellt ist.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und zur Herstellung der erfindungsgemäßen Membran wird eine Vorrichtung vorgeschlagen, die sich durch die nachfolgend genannten Merkmale dadurch auszeichnet, dass sie ein Gehäuse mit Boden, Wandung und ohne oder mit abnehmbarem Deckel aufweist, dass an dem Boden eine Schicht aus saugfähigem Material angeordnet ist, deren Außenmaße so gewählt sind, dass die Schicht bei annähernd mittlerer Anordnung auf dem Boden einen Abstand zur Wandung aufweist, und deren vom Gehäuseboden wegweisende Oberfläche als Träger für eine Membran geeignet ist, und dass am Boden eine Proteaselösung mit Abstand von der Oberfläche der Membran angeordnet ist, die die Schicht durchfeuchtet bzw. von dem saugfähigen Material der Schicht aufgenommen ist.

Infolgedessen steht die dieser Schicht aufliegende Membran ebenfalls in Kontakt mit der Proteaselösung und wird bzw. ist von dieser durchfeuchtet bzw. durchtränkt, und dasselbe gilt letztendlich auch für den auf der Membran angeordneten Gewebeschnitt.

Die Schicht aus saugfähigem Material kann sowohl einlagig als auch mehrlagig sein, und im Fall von mehreren Lagen können die einzelnen Lagen aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Material(ien) bestehen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. mit der damit hergestellten erfindungsgemäßen Membran ist es erstmals möglich, auch in formalinfixierten und in Paraffin oder ähnlichen Wachsen eingebetteten Geweben denaturierte

Proteine nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ und topographisch nachzuweisen, indem nämlich einfach die erfindungsgemäße Membran mit den darauf angeordneten Proteinen einem beliebigen immunhistochemischen Nachweisverfahren unterworfen wird. Dadurch hat das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Sensitivität als herkömmliche immunhistochemische Verfahren. Hierfür kommen insbesondere sämtliche im Stand der Technik bekannten und geläufigen immunhistochemischen Nachweisverfahren in Betracht. Damit geht insbesondere der Vorteil einher, dass jetzt auch solche Gewebeproben hinsichtlich bestimmter Proteine untersucht werden könnten, die schon vor vielen Jahren in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und bis heute archiviert wurden. Derartige Untersuchungen sind vor allem in der Erforschung und Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, die mit einer Ablagerung von Einweißstoffen (Proteinen) im Gehirn einhergehen, von großer Bedeutung. Hierzu zählen insbesondere Prionkrankheiten, wie z. B. der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, der Traberkrankheit (Scrapie), dem Rinderwahnsinn (BSE) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (Fetal Familial Insomnia = FFI) oder Krankheiten wie Morbus Alzheimer (bei der es zu einer Akkumulation von A-beta-Amyloid im Gehirn kommt).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es unter anderem erstmals gelungen, in Gewebeschnitten von an FFI erkrankten Patienten die topographische Verteilung von PrP^{Sc} (Prionprotein mit der Scrapie-Isoform) darzustellen.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden, ausführlichen Beschreibung anhand von Ausführungsbeispielen und der beigefügten Zeichnung.

Hierbei zeigt:

Fig. 1 eine erfindungsgemäße Inkubationskammer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die in Fig. 1 dargestellte Inkubationskammer 2 besteht aus einem wannenförmigen Gehäuse 4 mit einem abnehmbaren Deckel 6. Am Boden 8 des Gehäuses 4 ist eine Schicht 10 aus saugfähigem Material 12, beispielsweise aus Zellulosevliesstoff, angeordnet. Diese Schicht 10 kann – wie hier dargestellt – einlagig sein; sie kann aber ebenso gut auch aus mehreren Lagen bestehen, wobei die einzelnen Lagen dann aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Materialien bestehen können. Die Außenmaße der Schicht 10 sind so gewählt, dass sie bei mittlerer Anordnung auf dem Gehäuseboden 8 an allen ihren Rändern 12 einen Abstand zur Gehäusewand 14 einhalten kann. Der Boden 8 des Gehäuses 4 ist mit einer (Proteaselösung, Peptidaselösung, Proteinaselösung) 16 bedeckt, die außerdem die Schicht 10 durchfeuchtet bzw. die von dem saugfähigen Material dieser Schicht 10 aufgenommen ist. Auf der vom Gehäuseboden 8 wegweisenden Oberfläche 18 der Schicht 10 ist eine Nitrocellulosemembran 20 angeordnet, die auf ihrer von der Schicht 10 wegweisenden Oberfläche 22 einen Gewebeschnitt 24 aus formalinfixiertem und ursprünglich in Paraffin eingebettetem, nachträglich wieder deparaffiniertem Material trägt. Die dem Gewebeschnitt 24 abgewandte Oberfläche 26 der Nitrocellulosemembran 20 liegt der mit Enzymlösung 16 be- oder durchfeuchteten Schicht 10 vollflächig auf und ist infolgedessen ebenfalls von der Enzymlösung 16 befeuchtet oder durchtränkt. Der Gewebeschnitt 24 wiederum liegt der Nitrocellulosemembran 20 vollflächig auf und steht auf diese Art und Weise ebenfalls in Kontakt mit der Enzymlösung 16.

Wird nun der Gewebeschnitt 24 zusätzlich mit Enzymlösung 16 beträufelt bzw. überschichtet, so wandert die so aufgetragene Flüssigkeit durch den Gewebeschnitt 24 hindurch zur Nitrocellulosemembran 20, durch diese hindurch zur Schicht 10 und von dort aus ggf. der zuerdem Flüssigkeit in

den Randbereichen des Gehäuses 4 zwischen Gehäusewand 14 und Schicht 10. Um diesen erfindungsgemäßen Fließweg der Enzymlösung 16 zu gewährleisten, sollte der Flüssigkeitsspiegel 28 der Enzymlösung 16 immer unterhalb der vom Gehäuseboden 8 wegweisenden Oberfläche 18 der Schicht 10 liegen.

Beispiel 1

10 Immunhistochemischer (semiquantitativer) topographischer Nachweis von Proteinen in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben

Von einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wird ein Gewebeschnitt hergestellt, auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und zusammen mit dieser getrocknet.

Der Gewebeschnitt auf der Nitrocellulosemembran wird entparaffiniert, in die wässrige Phase überführt und getrocknet.

Die Nitrocellulosemembran mit dem Gewebeschnitt wird mit einer Proteaselösung (Peptidaselösung, Proteinaselösung) inkubiert. Dabei ist diese Proteaselösung an der Seite der Nitrocellulosemembran angeordnet, die dem Gewebeschnitt abgewandt ist, und sie steht mit der Oberfläche dieser Seite (d. h. mit der dem Gewebeschnitt abgewandten Oberfläche) entweder direkt oder indirekt, nämlich vermittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtem Material, in Kontakt.

Die dem Gewebeschnitt zugewandte Oberfläche der Nitrocellulosemembran und der Gewebeschnitt selbst wird von der angeordneten Proteaselösung bzw. von dem mit dieser Proteaselösung durchfeuchteten Material beabstandet bzw. gehalten.

Ein- oder mehrmalig in zeitlichen Abständen wird der Gewebeschnitt mit Proteaselösung beträufelt bzw. überschichtet, so dass der Fließweg dieser aufgeträufelten bzw. überschichteten Proteaselösung durch den Gewebeschnitt hindurch zur Nitrocellulosemembran und durch diese hindurch ggf. zu dem durchfeuchteten Material und durch dieses hindurch zur angeordneten Proteaselösung verläuft.

Zur Durchführung dieser Inkubation (des Gewebeschnitts auf der Nitrocellulosemembran mit einer Proteaselösung) eignet sich insbesondere eine Inkubationskammer gemäß Fig. 1 und dazugehöriger Beschreibung.

Nach ausreichender Inkubationsdauer, die von der Art und der zu überführenden Proteine und der Art der Proteaselösung abhängt und für einen Fachmann ohne weiteres ermittelbar ist, wird die Nitrocellulosemembran gewaschen und danach mit einem Proteindenaturierungsmittel inkubiert.

Anschließend wird die Nitrocellulosemembran nochmals gewaschen und ist dann einsatzbereit, beispielsweise und insbesondere für eine immunhistochemische Nachweisreaktion.

Beispiel 2

60 Immunhistochemischer Nachweis der Scrapie-Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc}) in formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Von einem formalinfixierten, bei Verdacht auf CJD Ameisensäuredekontaminiertem und in Paraffin eingebettetem (paraffindurchtränktem) Gewebekblock wird mittels einem, dem Fachmann bekannten und geläufigen Mikrotom ein etwa 5–7 µm dicker Gewebeschnitt abgeschnitten und auf eine Wasseroberfläche (Wassertemperatur ca. 40°C) aufge-

bracht. Eine handelsübliche Nitrocellulosemembran (beispielsweise von der Fa. Biorad) mit einer Porengröße von beispielsweise $0,45 \mu\text{m}$ wird auf einen handelsüblichen Glasobjektträger aufgelegt und im Wasserbad angefeuchtet. Anstelle der Nitrocellulosemembran kann auch eine andere geeignete Membran zum Einsatz kommen. Der schwimmende Gewebeschnitt wird mit der dem Objektträger aufliegenden Nitrocellulosemembran von der Wasseroberfläche abgenommen.

Objektträger und Membran mit aufliegendem Gewebeschnitt werden auf einer Wärmeplatte bei ca. 50°C für etwa 1 Minute angewärmt so daß sich der Gewebeschnitt streckt, und das Restwasser zwischen Gewebeschnitt und Nitrocellulosemembran wird vorzugsweise mit Zellstoff bzw. Filterpapier abgesaugt. Anschließend wird der Gewebeschnitt auf der Nitrocellulosemembran und dem Objektträger im Wärmeschrank bei ca. 55°C für mindestens 30 Minuten getrocknet. Nach der Trocknung kann die Nitrocellulosemembran mit dem darauf liegenden Gewebeschnitt von dem Objektträger abgenommen und entweder direkt weiter behandelt oder bis zur Weiterbehandlung gelagert werden.

Für die Weiterbehandlung wird der der Nitrocellulosemembran aufliegende Gewebeschnitt zunächst entparaffiniert, beispielsweise durch Inkubieren in Xylol für 2×5 Minuten, nachfolgendem Auswaschen des Xylols mit 100% Vol/Vol Isopropanol und abschließendem schrittweisem Ersetzen des Isopropanols durch Wasser im Wege eines Durchlaufs durch eine absteigende Isopropanol-in-Wasser-Verdünnungsreihe. Die letzte Stufe der Verdünnungsreihe, nämlich das 100%ige Aqua bidest, wird vorzugsweise mit einem Tensid, beispielsweise 0,1% Tween 20 versetzt.

Danach wird der Gewebeschnitt auf der Nitrocellulosemembran getrocknet und kann anschließend entweder direkt dem Nachweisverfahren unterworfen oder bis zur Weiterbehandlung gelagert werden.

Für den erfindungsgemäßen Nachweis beispielsweise der Scrapie-Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc}) wird der Gewebeschnitt auf der Nitrocellulosemembran zunächst mit Proteinase K verdaut. Dazu wird die Nitrocellulosemembran und dem darauf liegenden Gewebeschnitt zunächst in TBST (10 mM TrisHCl, pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,05% Tween 20) eingeweicht und anschließend für die Dauer von ca. 8 Stunden in einer geschlossenen Inkubationskammer bei ca. 55°C auf einer Unterlage aus saugfähigem Material, beispielsweise einer oder mehreren Zelluloselagen, inkubiert, die mit einer Lösung aus handelsüblicher Proteinase K (z. B. Fa. Sigma) in PK-Puffer (10 mM TrisHCl pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,1% Brij 35) in der Konzentration $250 \mu\text{g/ml}$ getränkt ist. Während der Inkubationsdauer wird der Gewebeschnitt mehrmals mit Proteinase-K-Lösung benetzt, z. B. durch Betropfen oder Übersichten. Dabei wird die für die Benetzung vorgesehene Menge an Proteinase-K-Lösung so gering gewählt, daß die zugegebene Flüssigkeit von der Unterlage, beispielsweise der(den) Zelluloselage(n), praktisch vollständig aufgesogen werden kann und kein Flüssigkeitsspiegel entsteht, der die Ebene, in der die Nitrocellulosemembran mit dem Gewebeschnitt liegt, übersteigt. Mit anderen Worten: Während die saugfähige Unterlage, beispielsweise die Zelluloselage(n), ganz oder zumindest teilweise in der Proteinase-K-Lösung liegt bzw. liegen darf, bleibt die Nitrocellulosemembran mit dem aufliegenden Gewebeschnitt immer oberhalb des Flüssigkeitsspiegels der Proteinase-K-Lösung angeordnet und wird – ausgenommen beim planmäßigen Benetzen – nicht von der Lösung bedeckt. Unter diesen Inkubationsbedingungen werden die durch den enzymatischen Verdau des Gewebeschnittes mobilisierten Proteine in die Nitrocellulosemembran überführt (bzw. transferiert bzw. "geblottet").

Im Anschluss an die Inkubation mit Proteinase-K-Lösung wird die Nitrocellulosemembran (samt dem weitgehend verdauten Gewebeschnitt) 3×5 Minuten zunächst in TBST gewaschen und anschließend für 10–20 Minuten bei Raumtemperatur in 4 M Guanidinium(iso)thiocyanatlösung (GdnSCH) in 10 mM TrisHCl pH 7,8 inkubiert, um die Proteine in der Nitrocellulosemembran zu denaturieren. Danach wird das GdnSCH mit TBST 3×5 Minuten ausgewaschen und die Nitrocellulosemembran in 0,2% Casein in TBST als Blockingreagenz (zum Blockieren, d. h. Besetzen unspezifischer Bindungsstellen für den nachfolgend zu Einsatz kommenden primären Antikörper) für ca. 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Nitrocellulosemembran mit einem primären Antikörper, der gegen das Prionprotein gerichtet ist, beispielsweise der im Handel erhältliche Antikörper BF4 (Firma dako) für 1–12 Stunden inkubiert. Hierfür wird der Antikörper mit Blockingreagenz auf die Antikörper-spezifische Konzentration, die im Stand der Technik üblicherweise für Westernblot-Immunreaktionen eingesetzt wird, verdünnt.

Bei Inkubationszeiten von mehr als 3 Stunden wird diese bei ca. 4°C durchgeführt, sonst bei Raumtemperatur.

Im Anschluss an diese Inkubation mit dem primären Antikörper wird die Nitrocellulosemembran 3×10 Minuten in TBST gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung mit Blockingreagenz für 1–12 Stunden unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie bei dem Primärantikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper dient beispielsweise im Fall von einem monoklonalen Primärantikörper aus einer Maus ein mit dem Enzym "Alkalische Phosphatase" gekoppelter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (z. B. von Fa. Dako, D0486), oder im Fall eines polyklonalen Primärantikörpers aus einem Kaninchen ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper. In jedem Fall sollten die sekundären Antikörper aufgereinigt sein, um unerwünschte, unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

Zum Sichtbarmachen der Immunreaktion wird die Nitrocellulosemembran einer Farbreaktion unterworfen. Hierfür wird die Nitrocellulosemembran zunächst 5×10 Minuten mit TBST gründlich gewaschen. Danach wird die Nitrocellulosemembran durch 2×5 Minuten Inkubation in NTM (100 mM TrisHCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl_2) auf einen basischen pH eingestellt. Für die eigentliche Farbreaktion wird die Nitrocellulosemembran anschließend für 7–75 Minuten (je nach Primärantikörper) einer Formazan-Reaktion mit $45 \mu\text{l}$ NTB (75 mg/ml) und $33 \mu\text{l}$ BCIP (50 mg/ml) in 10 ml NTM bei 4°C im Dunklen unterworfen. Im Anschluss an die Färbereaktion wird das Farbregenz mit PBS (= Phosphat-Buffer-Solution) ausgewaschen und die Nitrocellulosemembran in destilliertem Wasser von Salztückständen und Formazanresten gereinigt. Alle Reaktionsschritte werden auf einem Taumler durchgeführt.

Die Auswertung der Nachweisreaktion erfolgt unter einer Stereolupe nach dem Trocknen der Nitrocellulosemembran.

Für den Nachweis anderer Proteine als der Scrapie-Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc}) wird das gleiche Verfahren unter Verwendung entsprechend anderer Enzyme anstelle von Proteinase K durchgeführt. In der Praxis gut bewährt hat sich vor allem auch der Verdau mit Protease (1 mg/ml; z. B. Fa. Sigma) oder ein Doppelverdau mit Protease (1 mg/ml) und Proteinase K (250 $\mu\text{g/ml}$) bei bindegewebs-haltigen Gewebeschnitten (Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems).

Bezugszeichenliste

2 Inkubationskammer

4 Gehäuse
 6 Gehäuse
 8 Boden
 10 Schicht
 12 saugfähiges Material
 14 Gehäusewand
 16 Verdauungsenzymlösung
 18 Oberfläche der Schicht
 20 Nitrocellulosemembran
 22 Oberfläche
 24 Gewebeschnitt
 26 Oberfläche
 28 Flüssigkeitsspiegel

5

10

Patentansprüche

15

1. Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, **gekennzeichnet durch Art und Reihenfolge der folgenden Verfahrensschritte:**

20

- a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
 b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
 c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Proteaselösung, wobei

25

30

ci) die Proteaselösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und vermittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtetem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und wobei

35

cii) der Gewebeschnitt periodisch mit Proteaselösung beträufelt bzw. überschichtet wird,

40

d) Waschen der Membran,

e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran eine Nitrocellulosemembran oder eine andere geeignete Membran ist.

45

3. Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt, dadurch gekennzeichnet, dass die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung im Gewebeschnitt entspricht, und dass die Membran mit einem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellt ist.

50

4. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Gehäuse (4) mit Boden (8), Wandung und ohne oder mit abnehmbarem Deckel aufweist, daß an dem Boden (8) eine Schicht (10) aus saugfähigem Material (12) angeordnet ist, deren Außenmaße so gewählt sind, dass die Schicht (10) bei annähernd mittiger Anordnung auf dem Boden (8) einen Abstand zur Wandung (14) aufweist, und deren vom Gehäuseboden wegweisende Oberfläche (18) als Träger für eine Membran (20) geeignet ist, und dass am Boden (8) eine Proteaselösung (16) mit Abstand von der Oberfläche (18) der Membran (20) angeordnet ist, die die Schicht (10) durchfeuchtet bzw. von dem saugfähigen Material der

55

60

65

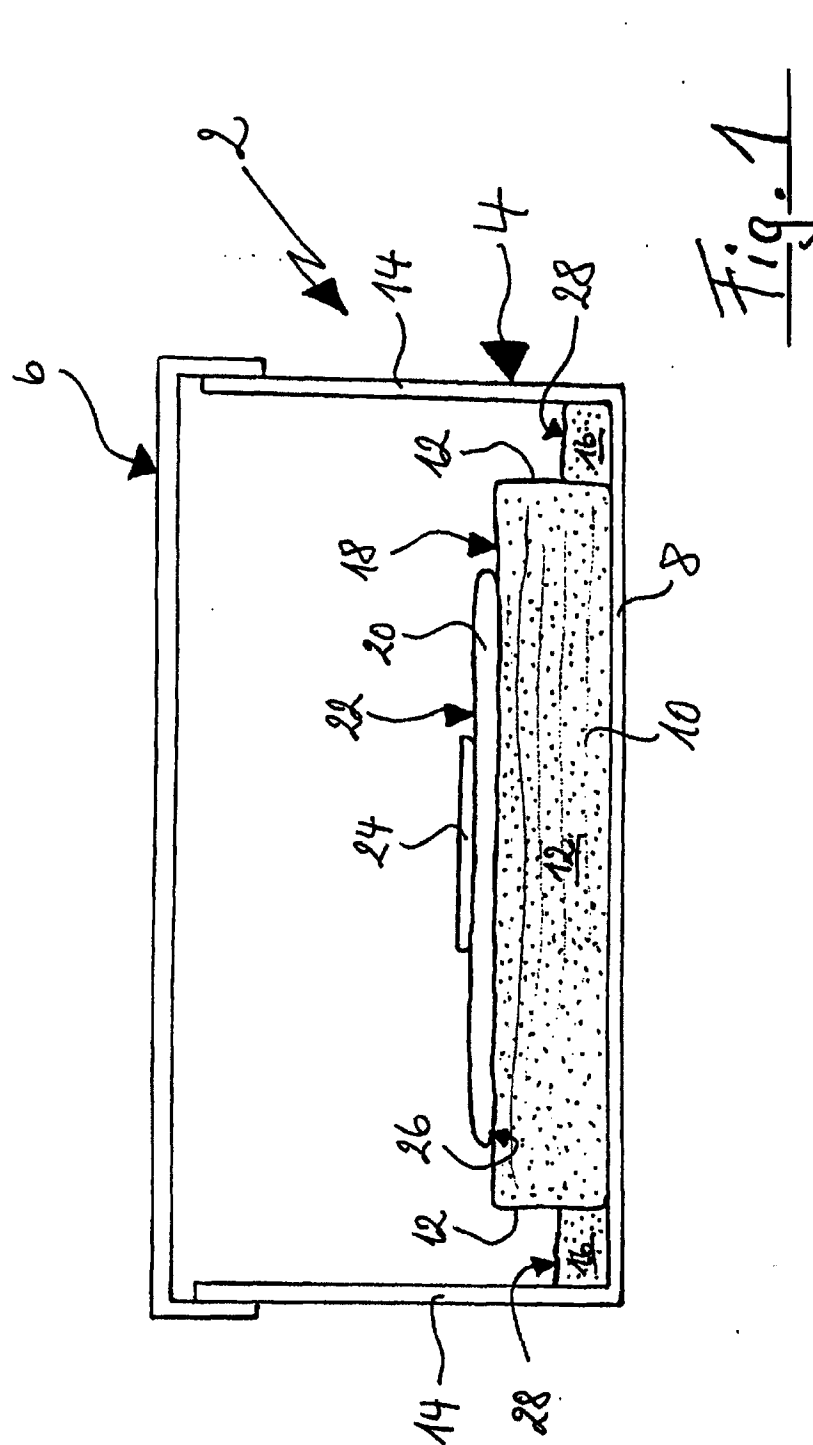
Schicht (10) aufgenommen ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Gehäuse (4) wannenförmig ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (10) einlagig ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (10) aus mehreren Lagen besteht, wobei die einzelnen Lagen aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Material(en) bestehen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



Original document

Diagnosing neurodegenerative disease, e.g., Creutzfeld-Jakob disease and Bovine Spongiform Encephalopathy, on formalin-fixed tissue sections comprises spreading and cleaning a tissue sample on membrane for incubation with protease solution

Publication number: DE19963198

Publication date: 2001-09-20

Inventor:

Applicant: SCHULZ SCHAEFFER WALTER (DE)

Classification:

- international: **C12Q1/37; G01N33/68; C12Q1/37; G01N33/68; (IPC1-7): C12Q1/37; C12M1/40; C12N11/12**

- European:

Application number: DE19991063198 19991227

Priority number(s): DE19991063198 19991227

[View INPADOC patent family](#)[View list of citing documents](#)[Report a data error here](#)

Abstract of DE19963198

A tissue section (I) is spread out on the upper side of a membrane (II). The paraffin wax is removed and (I) is dried on (II), then incubated with a protease solution (III). An absorbent layer soaked with (III) is brought into contact with the underside of (II). Periodically, (III) is trickled over (I), or coated over it. (II) is washed and finally incubated with protein denaturing agent. Independent claims are also included for the following: (1) a membrane with proteins from a tissue section arranged on its upper surface. Topological arrangement of proteins on the membrane corresponds with the original topological arrangement in the tissue section, the membrane having been prepared as described; and (2) an apparatus comprising a casing (4), base (8) and optional removable cover (6). On the base (8) a layer (10) of absorbent material (12) is arranged, dimensioned for central arrangement with spacing from the wall (14). Its upper surface (18) carries the membrane (20). The protease solution (16) at the base, soaks the absorbent. Preferred features: The casing is trough-shaped. The layer is single or multilayer, comprising the same, or different absorbent materials.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Description of DE19963198

[Translate this text](#)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. in